



COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

Attorney's Docket No.: 06501-102US1

GP 1645
#8
na

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Toshio Kitamura et al.
Serial No. : 10/092,925
Filed : March 6, 2002
Title : TSG-LIKE GENE

Art Unit : 1645
Examiner : Unknown

RECEIVED
SEP 09 2002
TECH CENTER 1600/2900

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 to Japanese Patent Application No. 11/252190, filed September 6, 1999. A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: Aug. 28, 2002

Jamie K. Fraser, Ph.D., J.D.
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.
225 Franklin Street
Boston, Massachusetts 02110-2804
Telephone: (617) 542-5070
Facsimile: (617) 542-8906

20478018.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

Date of Deposit Aug 29, 2002

Signature Nancy Bechet

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate
Nancy Bechet



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

RECEIVED

SEP 09 2002

TECH CENTER 1600/2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月 6日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第252190号

[ST.10/C]:

[JP 1999 - 252190]

出 願 人

Applicant(s):

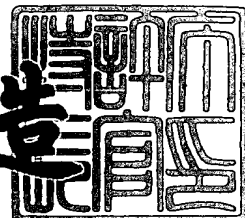
北村 俊雄
中外製薬株式会社



2002年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2002-3038989

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-106

【提出日】 平成11年 9月 6日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区白金 6 - 1 6 - 2 0 - 4 0 6

 【氏名】 北村 俊雄

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都港区南麻布 5 - 1 1 - 9 - 2 0 2

 【氏名】 森田 純代

【特許出願人】

 【識別番号】 599002744

 【氏名又は名称】 北村 俊雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000003311

 【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

 【識別番号】 100108774

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 041092

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 T S G 様遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 4】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 6】 請求項 5 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 7】 請求項 6 に記載の宿主細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 8】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 9】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項 10】 配列番号：1 に記載の塩基配列からなる DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 塩基の鎖長を有する DNA。

【請求項 11】 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに

結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 2】 請求項 1 1 に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から 3 のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、マウス胚AGM領域由来の新規なTSG様蛋白質およびその遺伝子に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

マウスの胎仔期初期の造血は、卵黄囊と胎仔肝臓で行なわれる。卵黄囊における造血は主に有核である胎仔型赤血球が産生され、胎仔型造血とよばれる。一方、胎仔肝臓における造血は有核の胎仔型赤血球を除くすべての系列の血球細胞が産生され、成体型造血と呼ばれる。

【0 0 0 3】

すべての系列の血球細胞を生じさせる活性、つまり造血幹細胞のLTR-HSC (long-term repopulating hematopoietic stem cell) 活性は胎仔型造血では検出されないが、成体型造血では検出される。このLTR-HSC活性を持つ細胞は実は胎仔肝臓に最初に生じるのではなく、胎生10～11日のAGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域にて発生・増幅し、その後胎仔肝臓へ移動するのではないかと考えられるようになってきた (Medvinsky A., et. al.: Cell, 86,897-906)。従って、このAGM領域には造血幹細胞の発生に重要な遺伝子が発現している可能性がある。

【0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、マウス胚AGM領域由来の新規なTSG様タンパク質およびその遺伝子を提供する。また、本発明は、該遺伝子が挿入されたベクター、該ベクターを保持する宿主細胞、該タンパク質に結合する抗体を提供する。さらに、本発明は、該タンパク質を利用して、受容体などの該タンパク質に結合する化合物をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、マウス胚AGM領域から新たなシグナル配列をもつ遺伝子を探索するために、独自に開発したシグナルシーケンスストラップ (signal sequence trap; SST) 法 (特願平9-324912号) を利用して、マウス胚AGM領域由来のポリA RNA を材料に、分泌・膜タンパク質をコードするcDNAのスクリーニングを行った。その結果、本発明者らは、ショウジョウバエ TSG遺伝子と相同性を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子を単離することに成功した。TSG遺伝子は胚の背側決定因子の1つであり、DPP (BMP2/4のカウンターパート) との相互作用により、dorsal midline cellの分化を決定していることが知られている (Mason E.D., et. al., Genes and Development, 8, 1489~1501)。単離されたTSG様遺伝子は、TSG遺伝子との構造的類似性により BMP2/4 と相互作用することが予想される。また、このTSG様遺伝子はマウス胚 AGM 領域から単離されたことより、造血幹細胞の発生に関与していることが示唆される。従って、本発明のTSG様タンパク質は、造血幹細胞の発生に関与する因子の精製やスクリーニング、さらには免疫・造血系関連疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングのためのツールとして有用である。

【 0 0 0 6 】

本発明は、新規なTSG様タンパク質およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (2) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、
- (3) 配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、
- (4) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、
- (5) (4) に記載のDNAが挿入されたベクター、

- (6) (5) に記載のベクターを保持する宿主細胞、
- (7) (6) に記載の宿主細胞を培養し、該細胞またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、
- (8) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体、
- (9) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド、
- (10) 配列番号：1 に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、
- (11) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
 - (b) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、
- (12) (11) に記載の方法により単離されうる、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物、に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明は、ショウジョウバエ TSG遺伝子と相同性を有する新規な蛋白質に関する。本発明者らにより単離されたマウス由来のcDNAの塩基配列を配列番号：1に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。この蛋白質は、そのN末端にシグナル配列を持ち、ショウジョウバエの胚の背側決定因子であるTSGタンパク質と相同性を有する。マウス組織由来のmRNAのノーザンブロット解析の結果、心臓・肺・肝臓・腎臓において約4.0kbのシグナルが認められた。また、胎生9、10、11、12、13日胚においても発現していることが確認された。この蛋白質が胚のAGM領域から単離されたこと、さらに初期胚において発現していること、TSG蛋白質と相同性を有しBMP2/4 と相互作用が推定されること、そして BMP2/4 は血球系の分化に必要であることなどから、この蛋白質は、造血細胞分化などに関与している可能性が示唆される。従って、この蛋白質

は、造血幹細胞の発生などに関連する蛋白質の精製やクローニング、さらには免疫・造血関連疾患の治療薬候補化合物のスクリーニングなどのための有用なツールとして利用しうる。

【0008】

本発明は、また、配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。このようなタンパク質には、例えば、配列番号：2に記載のタンパク質に対応する他の生物のホモログタンパク質や配列番号：2に記載のタンパク質の変異体が含まれる。本発明において「機能的に同等」とは、対象となるタンパク質が、ショウジョウバエ (*Drosophila*) のTSG変異体にインジェクションされた場合に、dorsal midline cell の分化をレスキューする活性や、アフリカツメガエル (*Xenopus*) 卵にインジェクションされた際に、胚の発生を制御する活性（例えば背腹誘導能など）を有することを指す。

【0009】

このようなタンパク質を単離するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が挙げられる。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh et al. (1995) *Gene* 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500, Kramer, W et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492, Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) などを用いて、配列番号：2のアミノ酸に適宜変異を導入することにより配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、配列番号：2に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは、15アミノ酸以内であり、さらに好ましくは5アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内であると考えられる。

【0010】

また、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、親水性アミノ酸 (R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G、A、V、L、I、P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S、T、Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C、M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D、N、E、Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。

【0011】

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

【0012】

配列番号：2 に記載のタンパク質に 1 又は複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質としては、例えば、配列番号：2 に記載のタンパク質を含む融合蛋白質が挙げられる。融合蛋白質は、配列番号：2 に記載のタンパク質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり本発明に含まれる。融合蛋白質を作製する方法は、本発明のタンパク質をコードする DNA と他のペプチド又は蛋白質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、すでに公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質は特に限定されない。

【0013】

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG

(Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個のHis (ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc の断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 α -tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを本発明のタンパク質をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

【0014】

また、機能的に同等なタンパク質を単離する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用した方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、配列番号：2 に記載のタンパク質をコードするDNA配列 (配列番号：1) もしくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから配列番号：2 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、配列番号：2 に記載のタンパク質をコードするDNA配列もしくはその一部からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2 に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、マウス以外の哺乳動物のホモログ (例えば、ヒト遺伝子がコードするタンパク質) が挙げられる。

【0015】

機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを単離するためのハイブリダイゼーションは、例えば、ストリンジェンシーが、10%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件で行うことができる。より好ましい条件 (よりストリンジェントな条件) としては、25%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハ

ルト溶液、1xサケ精子DNAの条件であり、さらに好ましい条件（さらにストリンジェントな条件）としては、50%ホルムアミド、5xSSPE、1xデンハルト溶液、1xサケ精子DNAの条件である。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては上記ホルムアミド濃度以外にも複数考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。また、ハイブリダイゼーションにかえて、タンパク質をコードするDNA（配列番号：1）の一部をプライマーに用いる遺伝子増幅法、例えば、PCR法を利用して単離することも可能である。

【0016】

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードする配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、配列番号：2に記載のタンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載の蛋白質と機能的に同等であり、かつ配列番号：2に示されるアミノ酸配列と高い相同性を有する蛋白質も含まれる。高い相同性とは、40%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%以上のアミノ酸配列の同一性を指す。蛋白質の相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

【0017】

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質が、配列番号：2に記載のタンパク質と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列のN末端にメチオニン残基が付加される。また、真核細胞、例えば哺乳動物細胞で発現させた場合、N末端のシグナル配列は除去される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。本発明の蛋白質のアミノ酸配列を解析した結果、シグナル配列は配列番号：2のアミノ酸配列において、1位のMetから24位のSerまでと推定された。したがって、本発明は配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、25位の

Cysから222位のPheまでからなる蛋白質を包含する。

【0018】

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、本発明のタンパク質を例えば可溶性タンパク質として細胞外に分泌させる。次いで、この細胞の培養上清を回収し、濃縮した後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製することが可能である。また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させ、発現させた組み換えタンパク質をグルタチオンカラム、あるいはニッケルカラムにより精製する。その後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去する方法により調製できる。天然のタンパク質であれば、例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞の抽出物に対し、後述する本発明の抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。

【0019】

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に対する抗体の作製、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニングや本発明のタンパク質の受容体のスクリーニング、本発明のタンパク質の競合阻害剤の調製などに利用し得る。また、例えば、受容体との結合能を有するが受容体を活性化する能力のない部分ペプチド（本発明の蛋白質の競合阻害剤として機能する）が含まれる。本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro*における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

【 0 0 2 1 】

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1に記載のDNA配列）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1に記載のDNA配列）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

【 0 0 2 2 】

得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

【 0 0 2 3 】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器（例えば心臓・肺・肝臓・腎臓などの臓器や胚など）から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwi

n, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia社) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

【 0 0 2 4 】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業社) 等を用いて行うこともできる。また、合成DNAをプライマーとして用いて、5'-AmplifINDER RACE Kit (Clontech社) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【 0 0 2 5 】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認することができる。

【 0 0 2 6 】

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, 43-74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA, TGA, 又はTAG) の挿入等が挙げられる。

【 0 0 2 7 】

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：1の塩基配列において87位の塩基Aから752位の塩基TからなるDNA、および159位の塩基Tから752位の塩基TからなるDNAを包含する。

【0028】

本発明のDNAはまた、配列番号：1に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ配列番号：2に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。ハイブリダイゼーションの条件としては上記の条件が挙げられる。ハイブリダイズするDNAは好ましくは天然由来のDNA、例えばcDNA又は染色体DNAであってよい。

【0029】

本発明のDNAは、本発明のタンパク質を組み換えタンパク質として生産するために利用することができる。また、本発明のタンパク質をコードするDNAに欠陥がある場合には、アンチセンスによる機能阻害や、正常な遺伝子に置き換える遺伝子治療などへの応用も考えられる。

【0030】

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

【0031】

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベク

ターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社）、「QIAexpress system」（Qiagen社）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

【 0 0 3 2 】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379）を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

【 0 0 3 3 】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen社）や、pEGF-BOS（Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」（GIBCO BRL社）、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZipneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen社）、pNV11、SP-Q01）、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター（Mulliganら、Nature (1979) 277, 108）、MLLV-LTRプロモーター、EF1 α プロモータ

ー (Mizushimaら, *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子(例えば、薬剤(ネオマイシン、G418など)により判別できるような薬剤耐性遺伝子)を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【0035】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター(例えば、pCHOIなど)を導入し、メトトレキサート(MTX)により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製起点を持つベクター(pcDなど)で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ(APH)遺伝子、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Ecogpt)遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(dhfr)遺伝子等を含むことができる。

【0036】

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター(例えばpAdexlcw)やレトロウイルスベクター(例えばpZIPneo)などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である(Molecular Cloning, 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

【 0 0 3 7 】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J. Exp. Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) やCHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリボソームDOTAP (ペーリンガー・マンハイム社) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

【 0 0 3 9 】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

【0040】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

【0041】

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

【0042】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

【0043】

例えば、目的とするDNAを、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (19

94) 12, 699-702)。

【 0 0 4 4 】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

【 0 0 4 5 】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

【 0 0 4 6 】

これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外（培地など）から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

【 0 0 4 7 】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の

液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

【0048】

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

【0049】

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

【0050】

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

【0051】

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

【0052】

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原

として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質を感作抗原として使用してもよい。

【0053】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

【0054】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0055】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

【0056】

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラ

ムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

【 0 0 5 7 】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常を選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

【 0 0 5 8 】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球をin vitroでタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【 0 0 5 9 】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、

プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【 0 0 6 0 】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【 0 0 6 1 】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（oncogene）により不死化させた細胞を用いてもよい。

【 0 0 6 2 】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

【 0 0 6 3 】

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙

げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

【 0 0 6 4 】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【 0 0 6 5 】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【 0 0 6 6 】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検

定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により行うことができる。

【0067】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia社)等が挙げられる。

【0068】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0069】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)、EIA(酵素免疫測定法)、RIA(放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia社)を使用することができる。

【0070】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。

【0071】

本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

【0072】

本発明はまた、配列番号：2に記載のタンパク質をコードするDNA（配列番号：1）または該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAには、本発明のタンパク質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイムをコードするDNA等）が含まれる。また、このようなDNAをDNAチップの作製に利用することもできる。

【0073】

本発明は、例えば、配列番号：1の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1の塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

【0074】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエ

ート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

【0075】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA またはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

【0076】

このようなDNAは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有する。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明のタンパク質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

【0077】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産生細胞に作用して、該タンパク質をコードするDNA又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNAの分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

【0078】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

【0079】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

【0080】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L- リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

【0081】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ～100mg/kg、好ましくは0.1 ～50mg/kg の範囲で投与することができる。

【0082】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

【0083】

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用した、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法、並びに該スクリーニング方法により単離しうる化合物（例えば、受容体、アゴニスト、およびアンタゴニスト）に関する。

【0084】

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え型、天然型又は部分ペプチドのいずれであってもよい。このスクリーニング方法の一つの態様は、（a）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、（b）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精

製したタンパク質として、可溶型タンパク質として、担体に結合させた形態として、他のタンパク質との融合タンパク質として、細胞膜上に発現させた形態として、また、膜画分として被検試料に接触させることができる。

【0085】

本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p. 193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAE デキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) を本発明の

タンパク質のN 末または C末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ抗体系としては市販されているものを利用することができる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

【0086】

融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン（His-tag）、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質（VSV-GP）、T7 gene10 タンパク質（T7-tag）、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質（HSV-tag）、E-tag（モノクローナルファージ上のエピトープ）などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

【0087】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

【0088】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

【0089】

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

【0090】

免疫沈降されたタンパク質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である ^{35}S -メチオニンや ^{35}S -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

【0091】

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合する結合タンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器 (例えば心臓・肺・肝臓・腎臓などの臓器や胚など) よりファージベクター (λ gt11, ZAP など) を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを LB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタ

ンパク質と結合したタンパク質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質に融合したペプチド又はポリペプチド（例えばGSTなど）に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

【 0 0 9 2 】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム（「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」（いずれもClontech社）、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（Stratagene社）、CytoTrap two-hybrid system（Stratagene社）、文献「Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」、文献「Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292」）を用いて行う方法が挙げられる。

【 0 0 9 3 】

2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明のタンパク質をSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製する。これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAに対応するタンパク質を得ることができる。

【 0 0 9 4 】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type 1) 遺伝子等を用いることができる。

【 0 0 9 5 】

本発明のタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。

【 0 0 9 6 】

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。

【 0 0 9 7 】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明のタンパク質と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia社）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本発明のタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

【 0 0 9 8 】

また、タンパク質に限らず、本発明のタンパク質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC et al., Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17

-9) が当業者に公知である。

【0099】

スクリーニングにより単離され得る化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質の発現異常や機能異常などに起因する疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

【0100】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物や本発明のタンパク質をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0101】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液

状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

【0 1 0 2】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

【0 1 0 3】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

【0 1 0 4】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

【0 1 0 5】

例えば、本発明のタンパク質の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから20mgであると考えられる。

【0 1 0 6】

例えば、本発明のタンパク質と結合する化合物や本発明のタンパク質の活性を

阻害する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

【0 1 0 7】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

【0 1 0 8】

【実施例】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0 1 0 9】

【実施例 1】 クローン106の単離

マウス胎生11.5日胚よりAGM領域を採取し、Fast Track (Invitrogen社) を用いてpolyA(+)RNAを調製した。SuperScript Choice System (GIBCO BRL) のランダムプライマーを用いて二本鎖cDNAを合成した。cDNAの末端平滑処理後BstXIアダプター (Invitrogen社) を付加し、SizeSep 400 Spun Column (Pharmacia社) を用いて400bp以上のcDNAを分画した。

別にBstXI (TAKARA社) 処理したpMXGM(-)v- mpl^{M2} (特願平9-324912号参照) と混合後T4 DNA ligaseによりライゲーションした。これをGene Pulser (Bio Rad社) を用いて電気穿孔法にて大腸菌DH10B (GIBCO BRL) に導入し、一晚培養した後、JETstarカラム (GENOMED社) を用いてcDNA ライブラリーを精製した。

【0 1 1 0】

パッケージング細胞であるBOSC23 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8392-8396, 1993) にLipofectAMINE (LIFE TECHNOLOGIES社) を用いてcDNA ライブラリーをトランスフェクションした。BOSC23を10% ウシ胎児血清 (FCS, JRH BIOSCIE

NCES社)を含むDMEM (LIFE TECHNOLOGIES社)で6cmディッシュに播き込み、16時間後DMEMで洗浄した。先に200 μ l DMEMで希釈した18 μ l LipofectAMINEと200 μ l DMEMで希釈したcDNA ライブラリー 3 μ gを混ぜて15分間室温で放置したものに1.6ml DMEMを混ぜて細胞に加えた。5時間後2ml の20%FCSを含むDMEMを加え19時間培養した。その後3mlの10% FCSを含むDMEMに置換し24時間後にその培養上清を回収した。この組み換えウイルスを含む培養上清にマウスインターロイキン-3(IL-3) 及び10 μ g/ml hexadimethrine bromideを加え、これにBa/F3を懸濁して感染させた。感染させて24時間後細胞をPBSにて3回洗浄し10% FCSを含むRPMI1640 (LIFE TECHNOLOGIES社)にて培養を続けた。IL-3非存在下で増殖してきたクローンからDNAを抽出し、cDNA挿入部位を挟むように設定したプライマー、5'-gggggTgg ACCATCCTCTA-3' (配列番号: 3) および5'-CgCgCAGCTgTAAACggTAg-3' (配列番号: 4) を用いてPCRを行いcDNA断片を回収した。PCRは500ng DNA、500pM 各プライマー、TaKaRaLA Taq (TAKARA社) 2.5単位、2.5mM MgCl₂、0.3mM dNTPs及び酵素添付緩衝液を含む反応液50 μ lについてGeneAmpPCR System2400 (Perkin Elmer社)で以下の条件にて行った。98℃・60秒の変成後、98℃・20秒、68℃・120秒のサイクルを30回行った。PCR反応物をアガロース電気泳動し、増幅された断片を含む部分を切り出して精製した。得られたDNA断片についての塩基配列を決定しアミノ酸に翻訳したところ、単離された遺伝子(clone 106)は、Drosophilaの遺伝子であるtwisted gastrulation (TSG) (Mason E.D., et. al., Genes and Development, 8, 1489~1501) とアミノ酸レベルで33%の相同性をもつことが判明した(図1)。DrosophilaのTSG遺伝子は胚の背側決定因子の一つと考えられ、この遺伝子の突然変異により中胚葉由来であるdorsal midline cellのみが分化できない。同じく背側決定因子であり、TSG遺伝子と相互作用するとされているDecapentaplegic (DPP)では、背側全体の分化が影響を受けるとのは著しく異なる。

【0 1 1 1】

〔実施例2〕 完全長cDNAの獲得

完全長cDNAを得るためにマウス胎生11.5日胚の cDNAライブラリーをoligo dT primerを用いて実施例1と同様に合成し、cDNA断片をプローブにスクリーニング

した。cDNAライブラリー 2 μ gをDH5 alpha (GIBCO BRL社) 50 μ lに加え氷温で30分置いた。42℃で30秒間 熱ショック (heat shock) を与えた後、約2分間氷温に置いた後、SOCを300 μ l加えて30分間37℃で培養した。これをNitroBind Nitrocellulose Transfer membrane (MICRON SEPARATIONS社) をひいた10cm dish LB plate (アンピシリンを含む) に1枚あたり30000~40000個大腸菌コロニーがでるようになりまいた。このメンブレン上に生えた大腸菌コロニーをBiodyne A transfer membrane (Pall) にトランスファーし、LB plate上で数時間コロニーを育てた。このBiodyne A transfer membraneを用いて、cDNAライブラリースクリーニングを行った。メンブレンを変性液 (0.5N NaOH, 0.5M NaCl) で5分間変性させた後、中和液 (0.5M Tris-HCl pH7.4, 1.5M NaCl) により、中和させた。2×SSCにより軽く洗浄して乾かした後に、1200JのUV照射により、DNAとメンブレンのクロスリンクを行った。

【0 1 1 2】

ハイブリダイゼーションは以下の手順で行った。まず、メンブレンをハイブリダイゼーションバッファー (50% ホルムアミド, 4.5% Dextran Sulfate, 0.1mg/ml サケ精子DNA, 6×SSC, 1% SDS) で2時間42℃でプレハイブリダイゼーションした。Prime-It (Stratagene社) を用いて、プローブとするクローン 106 DNA 25ngをRI標識し、熱変性させた後、ハイブリダイゼーションバッファーに加え、一晚放置した。

メンブレンの洗浄は2段階で行った。洗浄バッファー (2×SSC, 0.1% SDS) で42℃・10分間洗浄したのち、洗浄バッファー (0.1×SSC, 0.1% SDS) で55℃・30分間洗浄した。このようにして洗浄したメンブレンをレントゲンフィルムと密着させ、-80℃で感光させて現像した。

【0 1 1 3】

上記操作により1種類のクローンが得られ、塩基配列3986bpのcDNAであり、222アミノ酸をコードするオープンリーディングフレーム (87-752) が認められた。1-24アミノ酸がシグナル配列と推定される。cDNAの塩基配列を配列番号：1に、コードするアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0 1 1 4】

【実施例 3】 ノーザンハイブリダイゼーションによる cDNA クローンの発現解析
実施例 2 で得られた cDNA クローンをプローブとしてマウス Multiple Tissue Northern Blot (Clontech 社) を用いてノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ心臓・肺・肝臓・腎臓において約 4.0kb のシグナルが認められた。胎生 9、10、11、12、13 日胚においても発現していることが確認された。

【0 1 1 5】

【発明の効果】

本発明において見出されたタンパク質および遺伝子は *Drosophila* TSG 遺伝子のマウスにおけるカウンターパートである可能性があり、機能的に類似性していることが示唆される。本発明のタンパク質や遺伝子は、その胚の発生における役割を調べることで、造血幹細胞の発生に関連した分化のメカニズムの解明へ貢献しうる。また、免疫・造血系疾患の治療薬開発のためのツールとしても有用である。

【0 1 1 6】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> KITAMURA, Toshio

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> TSG-like gene

<130> C1-106

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3986

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (87)..(752)

<400> 1

cgcgaggagct gcttggaggc tcggcggccg ggaggaggcc ggggccacgc ttcttgaag 60

ctactgagtg acttctttga agaacc atg aag tca cac tat att gtg cta gct 113

Met Lys Ser His Tyr Ile Val Leu Ala

1

5

cta gcc tcc ctg acg ttc ctg ctg tgt ctc ccc gtg tcc cag agc tgt 161

Leu Ala Ser Leu Thr Phe Leu Leu Cys Leu Pro Val Ser Gln Ser Cys

10

15

20

25

aac aaa gca ctc tgt gcc agc gat gtg agc aaa tgc ctc att cag gag 209

Asn Lys Ala Leu Cys Ala Ser Asp Val Ser Lys Cys Leu Ile Gln Glu

30

35

40

ctc tgc cag tgc cgg cct gga gaa ggg aac tgc ccc tgc tgt aag gag 257

Leu Cys Gln Cys Arg Pro Gly Glu Gly Asn Cys Pro Cys Cys Lys Glu

45

50

55

tgc atg ctg tgc ctc ggg gcc ctg tgg gac gag tgc tgc gac tgt gtc 305

Cys Met Leu Cys Leu Gly Ala Leu Trp Asp Glu Cys Cys Asp Cys Val

60

65

70

ggt atg tgc aac cct cgg aat tac agc gac acc ccg ccc aca tcc aag 353

Gly Met Cys Asn Pro Arg Asn Tyr Ser Asp Thr Pro Pro Thr Ser Lys

75

80

85

agc acc gtg gag gag ctg cac gag ccc att ccg tcc ctg ttc agg gcg 401

Ser Thr Val Glu Glu Leu His Glu Pro Ile Pro Ser Leu Phe Arg Ala

90

95

100

105

ctg acg gag ggc gac acc cag ctg aac tgg aac atc gtc tcc ttc cct 449

Leu Thr Glu Gly Asp Thr Gln Leu Asn Trp Asn Ile Val Ser Phe Pro

110

115

120

gtg gca gag gag ctg tca cac cat gaa aac cta gtc tcc ttc cta gaa 497

Val Ala Glu Glu Leu Ser His His Glu Asn Leu Val Ser Phe Leu Glu

125

130

135

act gtg aac cag ctg cac cac caa aac gtg tct gtt ccc agc aac aat 545

Thr Val Asn Gln Leu His His Gln Asn Val Ser Val Pro Ser Asn Asn

140

145

150

gtc cac gcc ccc ttc ccc agc gac aaa gag cgc atg tgc aca gtg gtt 593

Val His Ala Pro Phe Pro Ser Asp Lys Glu Arg Met Cys Thr Val Val

155

160

165

tac ttt gat gac tgc atg tcc atc cac cag tgt aag ata tcc tgc gaa 641

Tyr Phe Asp Asp Cys Met Ser Ile His Gln Cys Lys Ile Ser Cys Glu

170 175 180 185

tcc atg ggt gca tcc aag tat cgc tgg ttt cac aac gcc tgc tgc gag 689

Ser Met Gly Ala Ser Lys Tyr Arg Trp Phe His Asn Ala Cys Cys Glu

190 195 200

tgc atc ggt cca gag tgc att gac tat ggg agt aaa act gtc aag tgt 737

Cys Ile Gly Pro Glu Cys Ile Asp Tyr Gly Ser Lys Thr Val Lys Cys

205 210 215

atg aac tgc atg ttt taaagagggg gaagaaatgc aaaccaaagc agtaagtcac 792

Met Asn Cys Met Phe

220

gaagtgtgca gaaatcttgg ttctggtatg ctaggagtggt gttaagttat atgattgtaa 852

ctgtgctttt tatatctggt gcctattagt gtaggtcttt tccattggat tcaatggaac 912

tttagtcaca tgaggatcgg gagttcagag gagtcctggg aaaacctgac atgctgacag 972

aagggtgccgt cttcttccag ctttccaaac acttctcggt ttgaacgtga tagcacaagc 1032

ctggtacatg tgtggttctc acctgccagt tgtagaacac taggtcccta tagtcacaca 1092

tctcttaatt gtgccttggc tggcttacct gttttgtatg agtaaattatt acagttttata 1152

attctaaca ctcacattca agccatgctg aaacttaatt tcaaaccact ttacattggt 1212

tttagaaagt aaatatattac tatattttac aacagaagag ttttgcctag ggccagcgag 1272

ctgactcagt ggataaaggc gcttgctacc aagcctgata acctgagttc catccccaga 1332

gcccgtacag tggaaggaca ggaccagctg ctgggagttg tcctctgacc tccagacagg 1392

cacagtatca tgcgtggagg tgtgcttggtg tgtgcacaca cataactaac tgtttttaaa 1452

aatataaacc tcttacctgg tgaaatctaa atctgtcgtg tagctctcac actgacagtg 1512

gtttggatgt tatgtcccct gtccgcctgt agtgctgggtg tggtagacaga cagagtcgtc 1572

actgctctgg tatagaagag ttttgtctac caagagtgtc atggcatacc tttggaactt 1632

catcaaatgc acttgaggat gacctgggtc aggaagtagc caggtaaaag cagcgggact 1692

gtaggcgatg ctccattaga ctccgtgcag agcagcaggt gcacagcata gctgggtgtg 1752

cggctgacca ggagagggtc tgactccgca ccagcagaac agcagggtct ccagcacgtg 1812

tgggaagcac gtgggagagg gttgaggaag gatgcacaga tgtggacaga gaagcataaa 1872

aatgtcggga actcctagta ggggccacct taaaatcgct ttatagtctc tggctttgtt 1932

actctgtaag attacacttg tttctggata tctgaatcca aataagcatc atattttaag 1992

aagctctgtt tctgaacttc cagggggaaa tctgtttaat gtgtttactc ctagcatact 2052

acagaatttt ctagctctat agcttcttac ctagcgtttc catagtgcctg agcttcatta 2112

ctacacgccc ttcttagtaa taaaattctc accttcaagc atgaatcaaa aacaaatata 2172

tataatacac aggttcaatt ttatagaatt gctattttct ctagtgcata tctcattaaa 2232

agtaactttt taggaataat ctttatatgg gtacatatat tggtacataa aatagaaaat 2292

gttcttaaac tcattttgta ttatttgaat agttacaaga tgatttggtg tatcatgggt 2352

accattata aacctgctc ttcccagtag ctgacgaact caaggtatca cagccttcta 2412

agaagccgac ttagaacatg gctgtacatg aatattatac attaaggtgt cctctcactt 2472

ctaccagag tgcctctggt caaagggtgcc ttggaaacat ttcagcccct tccttcttag 2532

ctcccacagg gctgtgggtg ttcttgaaat caggaggcgt tttgaaggac cacagctgct 2592

ccatttcagc cgctgattct taggaaagtt catgctctga cagaagtgtg ctttgatggc 2652

ttctagcggg gcatctcgtc tcgttttctt tgtttgtttt tgttgttgct atcatggttt 2712

ggtttggttt tgagacagga tctctgtgca gccctggctg gcctggaatg tactatgtag 2772

accaggctgg ctctctcat gttttcttag tgatggccat aaacattgtt aaaatacatc 2832

accatctttt aaaaactttt cattattaaa atttaaaata tagcatgtca tttttttacc 2892

ccatacattt gctatgaaaa attttttaaa ccacctgctt taactttttt attgccctgt 2952

ttttcctatt agaattgac cccactgagg taaattttat aatcatgttt tgtgtatttt 3012

tcctggctcg ccaaggctta tgaagaaata gcagccattc cctgacaggt ttgcgctccc 3072

accacagaga ggctgagcaa gatgatcaga ggatcaaggc cagccagagc aaggcactgc 3132

ccagaaagca caagtcctgt gctcagcgtt ttgcgtagcg tttattcct aattgaaatg 3192

taatatttca gaagctagca gcctcgtca gtctagacct tccacaccaa tctagcagcg 3252

attctcccggt actaaagcct ttgtaagagt ttacggttct tcctcagtga aaaatgatct 3312

tgtttttctt acagccggat ccaaagacgc tagatgttaa gggctgaggc tgaagcccgg 3372

tgacggggcg ctcacctgtc atgggtgcagc cctcgttcca ccgtgagcac cagcaagaga 3432

caaacacaag cttgtgagtc agaggccgtt attaaattca tacgcacata ctccctatag 3492

cgagacatgg gcttatgggc aggctttttt tttcataaca tttatgagaa aacaatgttt 3552

tccccataac atttaattag gactgtagct tatttgtaat taaggtaaa aatcaaagtc 3612

gagtagaatg tactgttcac acagcgtgtt gtgaaagggg tcctcacacc aaagttaaac 3672

tgtaaagttt agaaaaataa cattgtcatt agcatatttg aacacatatt tggaatttct 3732

aaaaagcatc aaaatagaaa aagaaagtga aactctggag aatgagatgc tgaagatggg 3792

ctatgatita aaggtctgtt ctgtagttag aaagcacctt ttaaagactt tgttcattcc 3852

caagagtcta tgttgattgc atttaacatg accgacaact tatatatgta attgtgtaca 3912

ttttcattgg ttgtctctgt agtccaaaag aaggtatttt aataaaaaat agaaatgact 3972

gtgaaaaaaaa aaaa 3986

<210> 2

<211> 222

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Lys Ser His Tyr Ile Val Leu Ala Leu Ala Ser Leu Thr Phe Leu

1 5 10 15

Leu Cys Leu Pro Val Ser Gln Ser Cys Asn Lys Ala Leu Cys Ala Ser

20 25 30

Asp Val Ser Lys Cys Leu Ile Gln Glu Leu Cys Gln Cys Arg Pro Gly

35 40 45

Glu Gly Asn Cys Pro Cys Cys Lys Glu Cys Met Leu Cys Leu Gly Ala

50 55 60

Leu Trp Asp Glu Cys Cys Asp Cys Val Gly Met Cys Asn Pro Arg Asn

65

70

75

80

Tyr Ser Asp Thr Pro Pro Thr Ser Lys Ser Thr Val Glu Glu Leu His

85

90

95

Glu Pro Ile Pro Ser Leu Phe Arg Ala Leu Thr Glu Gly Asp Thr Gln

100

105

110

Leu Asn Trp Asn Ile Val Ser Phe Pro Val Ala Glu Glu Leu Ser His

115

120

125

His Glu Asn Leu Val Ser Phe Leu Glu Thr Val Asn Gln Leu His His

130

135

140

Gln Asn Val Ser Val Pro Ser Asn Asn Val His Ala Pro Phe Pro Ser

145

150

155

160

Asp Lys Glu Arg Met Cys Thr Val Val Tyr Phe Asp Asp Cys Met Ser

165

170

175

Ile His Gln Cys Lys Ile Ser Cys Glu Ser Met Gly Ala Ser Lys Tyr

180

185

190

Arg Trp Phe His Asn Ala Cys Cys Glu Cys Ile Gly Pro Glu Cys Ile

195

200

205

Asp Tyr Gly Ser Lys Thr Val Lys Cys Met Asn Cys Met Phe

210

215

220

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gggggtggac catcctcta

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

cgcgagctg taaacggtag

20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 clone 106 (上段) とショウジョウバエ twisted gastrulation (TS

G) 遺伝子（下段）のコードするアミノ酸との相同性を示した図である。一致するアミノ酸配列にアステリスク（*）を施し、また類似したアミノ酸配列にドット（.）を施した。ギャップは、バーで補足した。

【書類名】 図面

【図 1】

1st Amino Acid Sequence

File Name : clone 106. full. seq. protein

Sequence Size : 222

2nd Amino Acid Sequence

File Name : TSG. protein

Sequence Size : 249

[33.3% / 216 aa]

```

1'  MKSHYIVLALASLTFLCLPVSQSCNKALCASDVSKCLIQELCQCRPGEGNCPCKEEM
    *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . .
1"  MQLLCYFVILFVGIAPWSSLANDDGCNEVVCGSVVSKCLITQSCQCKLND-CHCCKDCL

60'  LCLGALWDECCDCVGMCPNPNYSPTPPTSKSTVEELHEPIPSLFRALTEGDTQLNWNIVS
    ***. *. ***. *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . .
59"  NCLGELYIECCGCLDMCPKHKDVLPSLTPRSEIGDI-EGVPELFDLTAEDDE-GWSTIR

120'  FPVAEELSHHENLVSFLETVNQLHHQNVSVPSNNVHAPFSPDKERMCTVVYFDDCMSIHQ
    *.. . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
117"  FSMRAGFKQR-V-----QGGASGDAGNGNGNGNAGSAGVTLCTVIYVNSCIRANK

180'  CKISCESMGASKYRWFHNACCECIGPECIDYGSKTVKCMNCF
    *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . . *. . . . .
166"  CRQCESMGASSYRWFHDGCCECVGENCLNYGINESRCRGCPEDQDQLLTADTVPAEAEQ
    
```

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 マウス胚AGM領域由来の新規なTSG様タンパク質およびその遺伝子を提供することを課題とする。

【解決手段】 独自に開発した膜分泌タンパク質をコードする遺伝子の特異的クローニング法を用いることにより、マウス胚AGM領域由来 cDNAライブラリーから、ショウジョウバエTSG に相同性を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子を単離した。該遺伝子は、造血幹細胞の発生や、免疫・造血機能等を制御する医薬品開発のために有用である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599002744]

1. 変更年月日 1998年11月25日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都港区白金6-16-20-406

氏 名 北村 俊雄

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名 中外製薬株式会社